

Opinnäytetyö (AMK)

Bioanalytikkokoulutus

NBIOAK14

2017

Noora Morelius

NEONATAL 17ALFA-OH- PROGESTERONE TASOKALIBRAATTORIN UUDEN ERÄN KÄYTTÖÖNOTTO

Noora Morelius

NEONATAL 17ALFA-OH-PROGESTERONE TASOKALIBRAATTORIN UUDEN ERÄN KÄYTTÖÖNOTTO

Vastasyntyneiden seulonnan avulla voidaan seuloa näennäisesti terveistä vauvoista ne, joilla on jokin vakava hoidettavissa oleva aineenvaihduntasairaus. Seulonnan avulla diagnoosiin päästään nopeasti ja hoito pystytään aloittamaan riittävän ajoissa. 17alfa-OH-progesteronin seulontatutkimuksen haasteena on se, että viitearvot vaihtelevat useiden tekijöiden seurauksena. Kittierän vaihtumisesta johtuvia muutoksia pyritään minimoimaan seulonta tuotteiden valmistajan toimesta tasokalibraattorin käytön avulla.

Opinnäytetyön tavoitteena oli, että kehitetyt toimenpiteet voidaan jatkossa ottaa käyttöön muidenkin analyyttien referenssimateriaalierille. Kehitetyt toimenpiteet liittyivät tutkimuksen toteutukseen ja Combination Test –ohjelmistoon. Tässä opinnäytetyössä mitattiin uuden ja käytössä olleen tasokalibraattorierän 17alfa-OH-Progesterone pitoisuuksia AutoDELFIAlaiteilla. Vertailu tehtiin neljällä eri kittierällä.

Tulosten tarkastelussa havaittiin, että tulokset olivat hyväksyntärajoissa Combination Test –ohjelmiston perusteella. Tasokalibraattori erien välillä ei ollut merkittävää eroa standardien pitoisuuksiin. Tasokalibraattoreista mitatut pitoisuuksien trimmatut keskiarvot olivat hyvin lähellä toisiaan ja havaitut poikkeukset olivat merkityksettömiä. Eri laitteiden tulokset olivat myös riittävän lähellä toisiaan.

Tutkimuksesta voidaan todeta, että kehitetyt toimenpiteet ovat riittäviä uuden referenssimateriaali erän käyttöönotossa. Tulosten perusteella tehtiin yleinen ohjeistus uuden erän käyttöönotosta.

ASIASANAT:

17(alfa)-OH-Progesteroni, tasokalibraattori, vastasyntyneen seulonta.

Noora Morelius

INITIALIZATION OF NEW NEONATAL 17ALFA-OH-PROGESTERONE LEVEL CALIBRATORS

Most babies seem healthy when they are born, but a few of them have a rare metabolic disorder which can be found with newborn screening. Screening identifies these conditions and allows fast diagnosis and treatment before serious problems appear. 17 α -OH-Progesterone's screening test has a challenge that cut-off levels vary due to multiple factors. Use of level calibrators has been developed to enable minimizing manufacturer kit lot changes.

The purpose of this thesis was that developed procedures can be adjusted to others analytes's reference materials as well. Developed procedures were related to execution of study and Combination Test software. In this thesis, concentrations of 17 α -OH-Progesterone in a new and in use level calibrators lots were measured with AutoDELFIA device. The test were done by comparing four kit lots.

The results show that there is no significant differences in standards between level calibrator lots. Measured level calibrator trimmed means were similar and noticed aberrations were meaningless. Results between devices were also similar.

The results indicate that developed procedures were valid for initialization of new reference material lots. Based on the results general guidance of initialization were done.

KEYWORDS:

17 α -OH-Progesterone, level calibration, newborn screening

SISÄLTÖ

KÄYTETYT LYHENTEET TAI SANASTO	6
1 JOHDANTO	1
2 LISÄMUNUAISHYPERPLASIAN SEULONTA	2
2.1 Vastasyntyneen aineenvaihduntasairauksien seulonta	2
2.2 Lisämunuaishyperplasian taudinkuva	4
2.3 Lisämunuaishyperplasian seulonta 17 α -OH-progesteronin mittauksella	6
3 TASOKALIBRAATTORI REFERENSSIMATERIAALINA DELFIA MENETELMÄSSÄ	9
3.1 DELFIA menetelmäperiaate	9
3.2 DELFIA®/ AutoDELFIA® Neonatal 17 α – OH-progesterone analyysi	11
3.3 Referenssimateriaalien käyttö tasalaatuisten kittierien tuotannossa	12
3.4 Tasokalibraattorien käyttö referenssimateriaaleina	14
4 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITE JA TUTKIMUSONGELMAT	15
5 KÄYTÄNNÖN TOTEUTUS JA TILASTOLLINEN KÄSITTELY	16
5.1 Opinnäytetyön toteutus	16
5.2 DELFIA määrittäminen	16
5.3 AutoDELFIA määrittäminen	18
5.4 Tilastollinen käsittely	19
5.5 Metodologiset lähtökohdat	20
5.6 Eettiset lähtökohdat	21
6 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU	23
6.1 Uuden tasokalibraattorierän vaikutus kittikalibraattoreiden pitoisuuksiin	23
6.2 Ero uuden tasokalibraattorierän ja referenssikalkulaattorierän välillä	24
6.3 Analysointierien ja menetelmien välinen ero	27
7 POHDINTA	29
LÄHTEET	31

KAAVAT

Kaava 1. Keskiarvon 95%:n luottamusväli (Heikkilä 2014).	27
--	----

KUVAT

Kuva 1. Vastasyntyneen ihopistosnäyte (VSSH 2017).	10
Kuva 2. New Yorkissa käytössä olevat viitearvot (Pearce ym. 2016a).	13
Kuva 3. ELISA ja DELFIA menetelmän vertailu (PerkinElmer 2015a).	17
Kuva 4. 17 α -OHP menetelmäperiaate (PerkinElmer 2016d).	18
Kuva 5. DELFIA® Neonatal 17 α - OH-progesterone kitti (PerkinElmer 2016c).	23
Kuva 6. AutoDELFIA laite (PerkinElmer 2016a).	25

TAULUKOT

Taulukko 1. Standardien pitoisuudet (ng/ml) ja prosentuaalinen erotus eri tasokalibraattori erien välillä.	28
Taulukko 2. Uuden tasokalibraattorierän mitatut pitoisuudet (ng/ml) kittierillä 1-4 kuoppalevykohtaisesti.	29
Taulukko 3. Tasokalibraattoreiden pitoisuuksien tunnusluvut kittikohtaisesti.	29
Taulukko 4. Tasokalibraattorien trimmatut keskiarvot.	31
Taulukko 5. Uuden erän tasokalibraattorin vertailu referenssikalibraattoriin 95% luottamusväliä käyttäen.	31
Taulukko 6. Tasokalibraattorien mitatut pitoisuudet laitekohtaisesti.	32
Taulukko 7. Laitteelle 1 lasketut tunnusluvut ja 95% luottamusväli tasokohtaisesti.	32
Taulukko 8. Laitteiden väliset erot 95% luottamusvälin perusteella.	33

KÄYTETYT LYHENTEET TAI SANASTO

17-OHP	17-Hydroksiprogesteroni, steroidihormoni synteesin väli- tuote.
Autosomi	Somaattinen kromosomi, joka ei määrää ihmisen sukupuolta.
Androgeeni	Sukupuolihormoni, mieshormoni.
CAH	Synnynnäinen lisämunuaishyperplasia, engl. Congenital ad- renonal hyperplasia.
FIA	Fluoroimmunomääritys, engl. Fluoroimmuno assay.
Matriisi	Näyteympäristö.
SASKE	Synnynnäisten aineenvaihdunta sairauksien seulonta kes- kus.

1 JOHDANTO

Synnyynnäinen lisämunuaishyperplasia (engl. congenital adrenal hyperplasia, CAH) on yksi maailmanlaajuisesti seulottavista sairauksista. Sairautta voidaan seuloa vastasyntyneiltä mittaamalla 17α -hydroksiprogesteroni (17α -OHP) pitoisuus ja se tunnistetaan korkean 17α -OHP pitoisuuden perusteella (Terveysportti 2015; SASKE 2016a). Sairautta seulomalla voidaan estää vastasyntyneen pysyvää vammautumista, väärän sukupuolen asettamista ja vakavimmassa tapauksissa jopa kuolema (Pezzuti 2014; SASKE 2016b). Edellä mainittua sairautta voidaan seuloa erilaisilla menetelmillä, kuten tandemmassaspektrometrisillä ja immunokemiallisilla menetelmillä (Myllynen & Risteli 2016).

PerkinElmer on markkinajohtaja vastasyntyneiden seulontajärjestelmien toimittajana. (PerkinElmer 2015c). PerkinElmerin Neonatal 17α OHprogesterone reagenssisarja eli kitti on käytössä DELFIA- teknologiaa hyödyntyvissä seulontakeskuksissa (Votava 2012; Pearce ym. 2016a). 17α -OHP pitoisuus vaihtelee useiden tekijöiden seurauksena ja vääriä positiivisia tuloksia tulee runsaasti, koska väärien negatiivisten tulosten määrä on seulonnassa minimoitu (Lapatto 2015; Pearce ym. 2016b). Täten viitearvoja on vaikea asettaa 17α -OHP pitoisuudelle ja kunkin laboratorion tulee määrittää omat viitearvonsa huolellisesti (Stevens ym. 1995). Yksi vaikuttavista tekijöistä on kittierän vaihtuminen (Pearce ym. 2016b). Kittierän vaihtumisesta johtuvaa vaihtelua minimoidaan loppulaudunvalvonnassa käytettävän tasokalibraattorin avulla.

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena on kehittää menettelyä, jolla Wallac Oy:n referenssimateriaalien uudet erät (tässä työssä tasokalibraattorit) otetaan käyttöön. Wallac Oy on osa kansainvälistä PerkinElmer -teknologiakonsernia ja yksi konsernin merkittävimpiä tuotekehityksen, tuotannon ja markkinoinnin toimipisteitä (PerkinElmer 2015c). Opinnäytetyössä kehitetään Neonatal 17α -OHprogesterone – tasokalibraattorin uuden erän käyttöönottoon liittyviä tulosten analysointia ja käsittelyä. Tavoitteena on, että kehitetyt toimenpiteet voidaan jatkossa ottaa käyttöön muidenkin analyyttien referenssimateriaalien uusille erille. Laadukkaan tuotteen avulla löydetään näennäisesti terveistä vauvoista ne, joilla on jokin piilevä sairaus ja vähennetään imeväisyyskuolleisuutta. Sairauksien ennaltaehkäisy on kustannustehokkaampaa yhteiskunnalle kuin pysyvien vammojen hoito. Lisäksi laadukas tuote vähentää väärien positiivisten tulosten määrää, jolloin seulonnan kustannukset ja työmäärä vähenevät.

2 LISÄMUNUAISHYPERPLASIAN SEULONTA

2.1 Vastasyntyneen aineenvaihduntasairauksien seulonta

Neonataaliseulonta on vastasyntyneiden tutkimista (PerkinElmer 2016b). Sosiaali- ja terveysministeriö suosittelee harvinaisten synnynnäisten aineenvaihduntasairauksien seulontaa kaikille vastasyntyneille Suomessa (STM 2014). Synnynnäiset aineenvaihduntasairaudet johtuvat virheistä entsyymien, kuljetusproteiinien tai muita tärkeitä tehtäviä soluissa hoitavien proteiinien geeneissä. Geenivirhe häiritsee solujen toimintaa, jolloin oireita voi alkaa ilmetä piankin syntymän jälkeen. (Myllynen & Risteli 2016.) Lapsi voi vaihtaa ensimmäisten elinpäiviensä aikana täysin terveeltä vaikka sairastaisi vakavaa synnynnäistä aineenvaihduntasairautta. Pahimmillaan sairaus voi johtaa lapsen menettymiseen ensimmäisinä elinpäivinä. Seulontatutkimuksen avulla sairaus voidaan todeta riittävän ajoissa ja nopea hoidon aloitus lieventää tai estää kokonaan lapsen kehityksen häiriöitä. Arviolta yhdellä kahdestatuhannesta vastasyntyneestä on jokin seulonnalla löydettävissä oleva sairaus, jonka aiheuttamat pysyvät vauriot voidaan ennaltaehkäistä. (SASKE 2016b.)

Seulonnan eettisiin periaatteisiin kuuluu muun muassa se, että vain vakavia sairauksia seulotaan (Lapatto 2015). Maailman terveysjärjestön (engl. World Health Organization, WHO) linjauksen mukaan seulottavien sairauksien eettisiin periaatteisiin kuuluu myös se, että taudinkulkuun voidaan vaikuttaa, mikäli diagnoosiin päästään ajoissa. Tämän vuoksi perinnöllisten aineenvaihduntasairauksien seulonnassa seulotaan sairauksia, joissa riittävän varhain aloitettu hoito estää vaikeiden oireiden kehittymisen tai lieventää niitä merkittävästi. (Myllynen & Risteli 2016.) Synnynnäistä lisämunuaishyperplasiaa sairastavien tehokas seulonta vähentää vastasyntyneiden kuolleisuutta, joka on tärkein peruste seulonnalle (Barra ym. 2012). Aina ei kuitenkaan ole yhtä selkeää, onko sairauteen tarjolla riittävän hyvää hoitoa, jotta seulonta olisi perusteltua (Lapatto 2015).

Neonataaliseulonta aloitettiin Amerikassa ja Euroopassa 1960-luvulla, kun Robert Guthrie kehitti yksinkertaisen ja edullisen testin fenyyliketonurian (PKU) seulomiseen. Suomessa on 1980-luvulta lähtien vastasyntyneiltä seulottu kilpirauhasen vajaatoimintaa nappaverestä otetusta näytteestä. (Myllynen & Risteli 2016.) Valtaosassa länsimaita laajempi seulonta on aloitettu jo vuosia sitten ja useimmissa maissa on kansalliset seulontaohjelmat lisämunuaishyperplasian toteutukseksi vastasyntyneillä (Terveysportti 2015;

SASKE 2016b). Suomi on viimeinen länsimaista, joka on aloittanut laajemman perinnöllisten aineenvaihduntasairauksien seulonnan vastasyntyneiltä otetusta veripisaranäytteestä (Myllynen & Risteli 2016). Sosiaali- ja terveysministeriö suositti keväällä 2014 neljän muun sairauden seulontaa kilpirauhasen vajaatoiminnan lisäksi. Suomessa seulotaviin sairauksiin lisättiin lisämunuaisen hyperplasia (CAH), fenyyliketoniauria, glutaarihap-povirtsaisuuden tyyppi1 sekä rasvahappojen beta-oksidaation viat (MCAD- ja LCHAD-puutokset). Seulonta on vapaaehtoinen, mutta tavoitteena on mahdollisimman suuri kattavuus. (Lapatto 2015.)

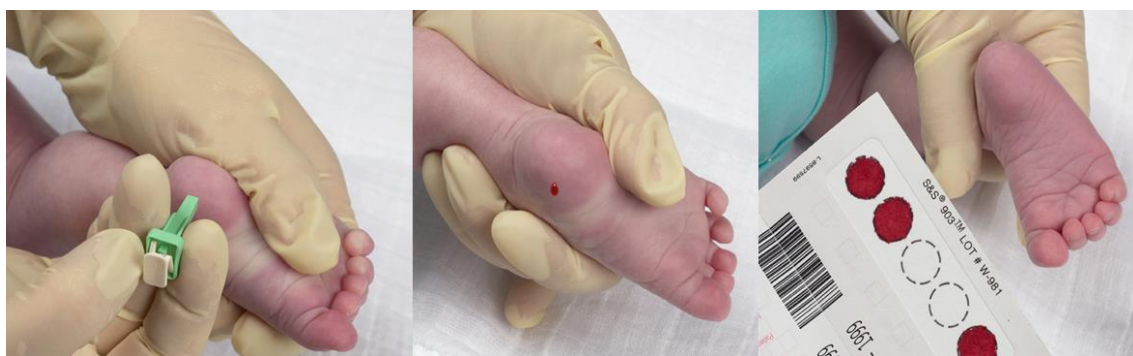
Samasta näytteestä voidaan yhdellä analyysillä seuloa useampia sairauksia (Lapatto 2015). Nykyisin pystytään seulomaan useita kymmeniä perinnöllisiä aineenvaihduntasairauksia vastasyntyneeltä otetusta veripisaranäytteestä käyttäen muun muassa tandemmassaspektrometriä ja immunokemiallisia menetelmiä. Synnynnäisten aineenvaihduntasairauksien seulontakeskuksen (SASKE) käytössä olevalla seulontaohjelmalla saadaan viitteitä hieman yli 20 sairaudesta. (Myllynen & Risteli 2016.) Tarkkoja tietoja näiden esiintyvyydestä Suomessa ei ole toistaiseksi tarjolla tutkimustiedon puuttuessa, mutta Suomessa syntyy arviolta 10 - 20 lasta, joilla on jokin tämän ryhmän tauti (Lapatto 2015; Myllynen & Risteli 2016).

Seulonnan herkkyys ja tarkkuus ovat erinomaiset (Lapatto 2015). Koska kyseessä on seulonta, kaikki löydökset eivät kuitenkaan merkitse sairautta (Myllynen & Risteli 2016). Pezzutin ym. (2014) Brasiliassa tehdyn kolmen vuoden seurannan aikana osa seulonnassa todetuista CAH potilaista todettiin myöhemmin terveiksi, joten tutkijoiden mukaan oikea diagnoosi tulee varmentaa asianmukaisesti. Väärien negatiivisten tulosten määrä on seulonnassa minimoitu, joten vääriä positiivisia tuloksia tulee väistämättä. Seulontatulos on nopeasti varmennettava sopivin menetelmin, joita ovat muun muassa steroidihormonien mittaukset sekä geenitutkimukset. Positiivinen seulontatulos käynnistää siis varsinaiset diagnostiset tutkimukset ja osassa tapauksista lapsi todetaan jatkotutkimuksissa terveeksi. Kussakin synnytyssairaalassa tulee olla toimintasuunnitelma, joka takaa nopean yhteyden perheeseen ja tarvittavien selvitysten asianmukaisen suorittamisen. (Lapatto 2015; Myllynen & Risteli 2016.)

Vaikka laajempi seulonta on Suomessa vasta alkamassa, maailmanlaajuisesti on jo erilaisissa kansallisissa seulontaohjelmissa kokemusta miljoonista vastasyntyneistä. Synnynnäisten aineenvaihduntasairauksien seulonta on havaittu toimivaksi, ja monien tautien hoitotulokset ovat erinomaisia. (Stevens ym. 1995; Pearce ym. 2016a; Myllynen &

Risteli 2016.) Synnyynnäisen lisämunuaishyperplasian (CAH) esiintyvyys vaihtelee maailmanlaajuisesti ja eri rotujen välillä (Stevens ym. 1995; Pearce ym. 2016a). Stevens ym. (1995) Saudi-Arabiassa tehdyn tutkimuksen mukaan ennen kansallisen seulonnan aloittamista tulisi määrittää terveen vastasyntyneen 17 α -hydroksyyliprogesteroni (17 α -OHP) pitoisuus, johon vaikuttavat muun muassa näytteenottoaika ja sukupuoli.

Suomessa alkoi syksyllä 2014 valtakunnallinen laajempi vastasyntyneiden aineenvaihduntasairauksien seulonta. Aineenvaihduntatuotteiden kertymiselle on tärkeää, että lapsi on ollut jonkin aikaa oman aineenvaihduntansa varassa, joten napaverta ei voida käyttää näytteenä. Nykyisessä seulonnassa otetaan 2-5 vuorokauden ikäisestä lapsesta ihopistosnäyte kantapään sivusta kapillaarin avulla imupaperiin (Kuva 1.). Näyte ilmakeivataan ja lähetetään Turussa sijaitsevaan seulontakeskukseen (SASKE), joka seuloo kaikki Suomessa vuosittain syntyvät noin 60000 lasta. (Lapatto 2015; VSSHP 2017.)



Kuva 1. Vastasyntyneen ihopistosnäyte (VSSHP 2017).

2.2 Lisämunuaishyperplasian taudinkuva

Suomessa syntyy 4-5 CAH-tautia sairastavaa lasta vuodessa ja synnyynnäisen lisämunuaishyperplasian esiintyvyys on noin 1/10 000-1/20 000 (SASKE 2016a). Lisämunuaishyperplasiana eli synnyynnäisenä lisämunuaisten liikakasvuna tunnetaan ryhmä sairauksia, jotka johtuvat viasta lisämunuaiskuoren steroidihormonien tuotannossa (PerkinElmer 2016b; SASKE 2016b). Sairauden vaikeusaste vaihtelee eri potilailla riippuen taustalla olevasta geenivirheestä ja tarkemmin tuntemattomista muista tekijöistä (Myllynen & Risteli 2016). Sairaus on autosomissa peittyvästi periytyvä ja viallinen geeni on saatu molemmilta vanhemmilta, jotka ovat terveitä kantajia (SASKE 2016a). Usein pe-

rinnöllistä lisämunuaishyperplasiaa sairastava lapsi on syntyessään oireeton, mutta selvissä tapauksissa tytöillä on poikien sukupuolielimiä muistuttavat ulkoiset sukupuolielimet (Marumudi ym. 2013).

Steroidit osallistuvat tärkeisiin elintoimintoihin kuten sokeri-, suola-, ja nestetasapainon säätelyyn (SASKE 2016b). Steroidiaineenvaihdunnan entsyymipuute aiheuttaa steroidihormonien biosynteesiin häiriön, jonka säätelyssä kortisoli on keskeinen (Marumudi ym. 2013). Häiriö on yhdessä viidestä entsyymistä, joista yleisin, yli 90 % tapauksista, on 21-hydroksylaasi entsyymin aktiivisuuden väheneminen tai puutos. Tämä sairauden muoto tunnetaan myös nimellä CYP21 tai klassinen CAH ja se ilmenee entsyymiaktiivisuuden voimakkuudesta riippuen jo vastasyntyneellä tai viimeistään murrosikäisellä lapsella. (Terveyskirjasto 2015; PerkinElmer 2016b.)

Heikentynyt kortisolin tuotanto stimuloi säätelyjärjestelmän välityksellä aivolisäkkeen tuottamaan kiihtymässä määrin kortikotropiinia (ACHT), joka puolestaan stimuloi lisämunuaiskuorta syntetisoimaan ja erittämään lisää kortisolin esiasteita. Tämä johtaa siihen, että lisämunuaiskuoren koko kasvaa ja aktiiviset steroidihormonien esiasteet muuttuvat entsyymipuutoksen johdosta androgeeneiksi. Toimivan 21-hydroksylaasin puuttuessa androgeenien suurentunut määrä aiheuttaa tyttösikiöille virilisaation (poikia muistuttavat ulkoiset sukupuolielimet). (Marumudi ym. 2013.) Kortisolin lisäksi myös aldosteronin valmistuksessa tarvitaan 21-hydroksylaasia ja noin 75 % klassista muotoa sairastavista potilaista kärsii myös pahasta suolatasapainon häiriöstä (Terveyskirjasto 2015; PerkinElmer 2016b). Vaikeimmissa tapauksissa hyvin matala CYP21 aktiivisuus aiheuttaa matalan aldosteronin erittymisen, suolan menetyksen ja hypovolemian eli veren tilavuuden pienenemisen. Samanaikainen kortisolin puutteen aikaan saama matala verenpaine ja hypoglykemia johtavat lapsen menehtymiseen muutaman viikon ikäisenä ellei sairautta havaita ja hoideta ajoissa. (PerkinElmer 2016b.)

Sairautta voidaan seuloa vastasyntyneiltä mittaamalla 17α -OHP pitoisuus veritäplänäytteestä (Terveysportti 2015; SASKE 2016a). Positiivinen seulontatuloks varmennetaan Suomessa määrittämällä 17α -OHP pitoisuus laskimoverinäytteestä. Sairaus on hoidettavissa puuttuvilla hormoneilla (hydro- ja fludrokortisonilääkityksellä) sekä tarvittaessa suolalisän avulla. Lääkitystä jatketaan koko eliniän. (SASKE 2016a.) Selvissä tyttölasten virilisaatioissa tarvitaan myös kirurgista hoitoa. Sikiöaikaista virilisaatiota voidaan myös estää äidin deksametasonilääkityksellä. (Marumudi ym. 2013.)

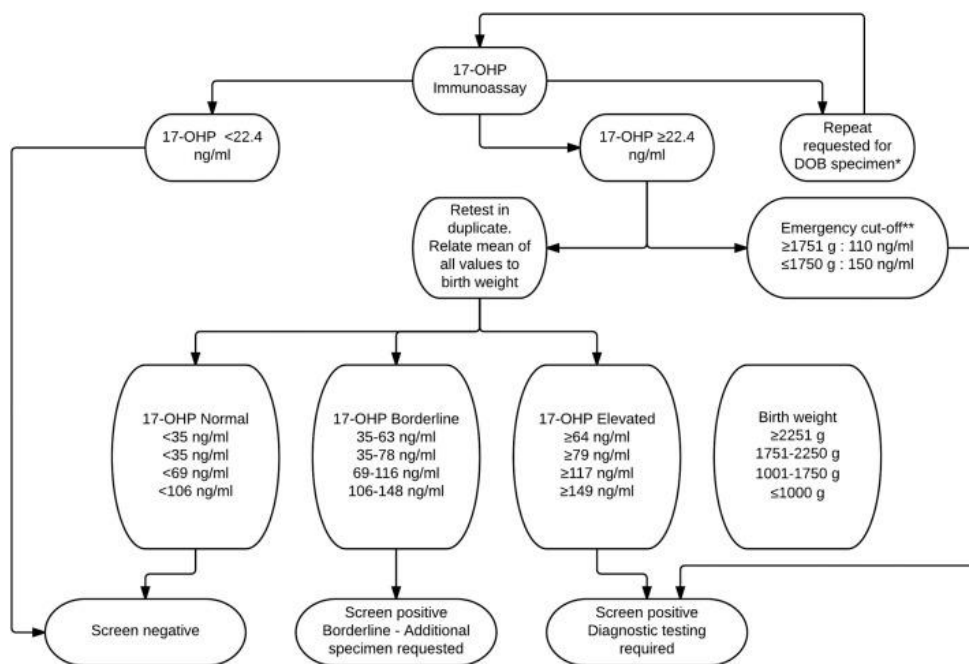
2.3 Lisämunuaishyperplasian seulonta 17 α -OH-progesteronin mittauksella

17-Hydroksiprogesteroni (17-OHP) on steroidihormoni synteessin välituote, jota syntetisoidaan lisämunuaisten kuorikerroksessa, munasarjoissa ja kiveksissä. Lisämunuaisten kuorikerroksessa 17-OHP muuttuu 21-hydroksylaasientsyymin vaikutuksesta deoksikortisoliksi ja eri entsyymivaiheiden jälkeen kortisoliksi. 21-hydroksylaasi puutoksen klassisessa muodossa tauti ilmenee jo ennen syntymää ja 17-OHP pitoisuudet ovat vastasyntyneellä tyypillisesti 10 -100 kertaa suurempia normaaliin verrattuna. (VITA 2014.) CAH seulonta on suunniteltu havaitsemaan pääsääntöisesti vain vakavia sairauden muotoja. Sairaus vaihtelee klassisesta vakavasta suolanmenetysmuodosta, klassiseen vähemmän vakavaan virilisoivaan muotoon sekä lievempiin ei-klassisiin muotoihin. (Votava ym. 2012; Pearce ym. 2016a.)

17 α -OHP pitoisuus vaihtelee useiden tekijöiden seurauksena ja vääriä positiivisia tuloksia tulee runsaasti (Lapatto 2015; Pearce ym. 2016b). Suurin osa vastasyntyneiden seulonnan vääristä positiivisista tuloksista koskee juuri synnynnäistä lisämunuaishyperplasiaa (Myllynen & Risteli 2016). Normaali 17 α -OHP pitoisuus vaihtelee muun muassa sukupuolen, syntymäpainon ja sikiöiän mukaan, joten viitearvot tulee asettaa huolellisesti (Stevens ym. 1995; Votava ym. 2012; PerkinElmer 2016b; Pearce ym. 2016a). Yksi suurimmista haasteista onkin määrittää viitearvot 17 α -OHP pitoisuudelle kustannustehokkaasti (Barra ym. 2012). Ennenaikaisilla ja alhaisen syntymäpainon omaavilla vauvoilla tavataan eniten vääriä positiivisia tuloksia, jotka asettavat diagnostisia vaikeuksia (Pezuzzi ym. 2014). Ristireaktiot steroidisulfaattien kanssa ovat yksi pääsyy vääriille positiivisille tuloksille etenkin ennenaikaisilla, sairailta sekä stressaantuneilla vauvoilla. CAH seulontaa on kehitetty asettamalla viitearvoja sikiöiän ja syntymäpainon mukaan ja varmentamalla diagnoosin molekyyli-genetiikan tai nestekromatografia-tandemmassaspektometrin avulla. (Fingerhut 2009; Votava ym. 2012.)

PerkinElmerin AutoDELFIA Neonatal 17 α -hydroxyprogesterone kitti on käytössä useissa seulontakeskuksissa (Votava ym. 2012; Pearce ym. 2016a; Pearce ym. 2016b). Kitti on kaupallinen reagenssisarja, jolla saadaan tehtyä jokin laboratoriomenetelmä tai analyysi käyttämällä yhden valmistajan tuotteita (Suominen ym. 2010). Pearce ym. (2016a) tekemän kahdeksan vuoden seulontatulosten analysoinnin perusteella tutkijat havaitsivat 3 vääriä negatiivista tapausta New Yorkissa. Tapaukset olivat klassisia vähemmän vakavia virilisoivia muotoja, joissa diagnoosiin päästiin kliinisen tutkimuksen avulla eli ha-

vaitsemalla tyttölapsilla epänormaali genitaalialue. Koko tutkimuksen aikana diagnosoi-
tiin 108 vahvistettua CAH tapausta noin kahdesta miljoonasta seulotusta. Tutkimuksessa
myös havaittiin, että tytöillä on matalampi 17 α -OHP pitoisuus verrattuna poikiin ja suu-
rempi syntymäpaino laskee pitoisuutta, joka otettiin huomioon viitearvoissa (Kuva 2.).
Menetelmän herkkyys oli vuosina 2007–2010 välisenä aikana 95 % ja spesifisyys 99,9
% sekä positiivisten tulosten ennuste (engl. positive predictive rate, PPV) oli 2,9 %. Kit-
timuutoksen, jossa vasta-aine muuttui valmistajan toimesta ja viitearvot laskivat vuonna
2010, myötä vuosina 2010–2014 herkkyys kohosi 98,5 %:iin ja PPV tuplaantui (5,8 %).
Muutoksen myötä rajatapaukset kuitenkin lisääntyivät. Votavan ym. (2012) Tšekeissä
tehdyn tutkimuksen mukaan 17 α -OHP:n viitearvot riippuvat syntymäpainosta, näytteen-
ottoajasta sekä käytetystä kitistä. Viitearvot vaihtelivat tutkimuksen aikana 20-200nmol/l
välillä. Tutkimuksen aikana diagnosoi-
tiin 48 CAH tapausta noin 550000 seulotusta vas-
tasyntyneestä. Herkkyys tutkimuksessa oli 98 %, spesifisyys 99,5 % ja PPV 1,6 %.



Kuva 2. New Yorkissa käytössä olevat viitearvot (Pearce ym. 2016a).

Pearce ym. (2016b) vuosina 2007–2015 tehdyn tutkimuksen mukaan sääolot ja kittierän
vaihtuminen vaikuttavat 17 α -OHP pitoisuuksiin. Aineistona tutkijat käyttivät 2,2 miljoo-
naan vastasyntyneen seulontatulosta, jonka perusteella kylmien kuukausien aikana 17 α -
OHP pitoisuudet olivat korkeampia, uusintatestejä ja varmuksia tehtiin enemmän
vaikka lapsia syntyi vähemmän kuin lämpiminä kuukausina. Kittierää vaihdettiin 3-6 kuu-

kauden välein tutkimuksen aikana. Päivittäin tilastoiduissa seulontatulosten keskiarvossa tapahtui 10 %:n nousu verrattuna kaksi vuotta ennen ja jälkeen kittierän muutoksen, joka tapahtui marraskuussa 2013. Tutkimustulos viittaa siihen, että kittierän toiminnassa olisi tuona aikana tapahtunut muutos, koska muita muutoksia ei tänä ajankohtana tapahtunut. Aiemmin mainitusta kittimuutoksesta, jossa vasta-aine vaihtui sekä viitearvot muuttuivat vuonna 2010, oli raportoitu valmistajan toimesta tutkimuksen aikana. Tutkijoiden mukaan kaikkia 17-OHP pitoisuuteen vaikuttavia tekijöitä on kuitenkin liian monimutkaista ottaa huomioon viitearvoissa. (Pearce ym. 2016b.)

3 TASOKALIBRAATTORI REFERENSSIMATERIAALINA DELFLA MENETELMÄSSÄ

3.1 DELFLA menetelmäperiaate

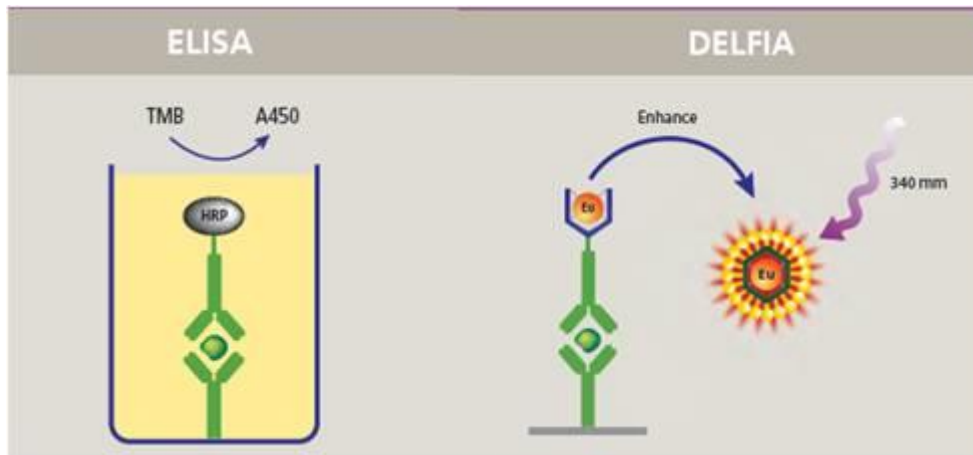
DELFLA- (engl. Dissociation Enhanced Lanthanide Fluoroimmunoassay) teknologia perustuu harvinaisten maa-alkalimetallien eli lantanoidien käyttöön merkkiaineena eli immunokemiaan ja aikaeroitteiseen fluoresenssimittaukseen (Van Emon 2007). Aikaeroitteinen fluorometria on suomalaisen Wallac Oy:n keksintö, joka on yleisessä käytössä monissa merkkiainemäärityksissä. Lantanoidien viivästynyttä fluoresenssia hyväksikäyttäen saadaan poistettua näytteestä aiheutuva taustafluoresenssi. (Åkerman 2010.) DELFLA määrityksille onkin täten saatu erittäin suuri herkkyys ja laaja kliinisesti merkittävän mittausalue (Van Emon 2007; Åkerman 2010).

Yleisesti immunokemiallisia menetelmävaihtoehtoja eri lääketieteellisiin laboratoriosovelluksiin on runsaasti tarjolla (Savolainen & Parviainen 2010). Immunokemialliset määritykset perustuvat antigeenin ja vasta-aineen väliseen spesifiseen reaktioon, jonka avulla näytteestä on mahdollista tunnistaa tutkittava antigeeni (Åkerman 2010). Yhdistettävä, joka aiheuttaa elimistössä immuunivasteen, kutsutaan antigeeniksi. Esimerkiksi autoimmuunisairauksissa antigeenit ovat elimistön omia rakenteita ja ne voivat olla esimerkiksi valkuaisaineita tai entsyymejä. (Haapala 2010.) Vasta-aineet ovat puolestaan selkärankaisten immuunijärjestelmän tuottamia proteiineja, jotka tunnistavat elimistölle vieraita aineita eli antigeenejä sitoutumalla niihin spesifisti (Tieteen termipankki 2014). Immunokemiallisissa menetelmissä antigeeni tai vasta-aine on leimattu jollakin mitattavissa olevalla merkkiaineella eli leimalla. Automatisoiduissa sovelluksissa käytetään merkkiaineina muun muassa entsyymejä sekä fluoresenssiin tai kemiluminesenssiin perustuvia leimoja. Immunokemiallisten menetelmien detektioherkkyttä ja kemiallista spesifisyyttä on lisätty esimerkiksi aikaeroitteisen fluoresenssin tai kemiluminesenssiin perustuvilla merkkiaineilla. Kiinteäfaasitekniikoissa vasta-aine voi olla sidottu esimerkiksi koeputken tai kuoppalevyn kuopan seinämään. (Savolainen & Parviainen 2010.) DELFLA menetelmässä on käytössä joko leimattu antigeeni tai vasta-aine (PerkinElmer 2015a).

Kliinisessä analytiikassa käytettyjä immunokemiallisia määritysmenetelmiä ovat muun muassa ei-kilpailevat, kilpailevat ja immunologiset menetelmät (Savolainen & Parviainen 2010). Jälkimmäisestä käytetään myös nimitystä kaksoisvasta-ainetekniikka (Halonen

2004). PerkinElmerin tuotteiden määitykset ovat IFMA- (eng. Immunofluorometric assay) ja FIA-tyyppisiä (engl. Fluoroimmuno assay). Määitykset perustuvat vasta-ainereaktioon, jossa merkkiaineena käytetään fluoresoivaa yhdistettä. (PerkinElmer 2016e.). Fluoresenssi saadaan aikaan viritysvalolla, jonka avulla molekyylin tietty elektronit virityvät korkeammalle energiatasolle (Åkerman & Jokela 2010, 57). Fluoresenssi on ilmiö, jossa aineen molekyylit ensin absorboivat fotonin ja emittoivat eli lähettävät sen jälkeen matalaenergisemmän fotonin, jolla on suurempi aallonpituus ja joka havaitaan näkyvänä valona (Tieteen termipankki 2017). Emissiospektrometriassa mitataan valoa, jota virittyneessä tilassa oleva atomi tai molekyyli emittoi siirtyessään korkeammalta alemmalle energiatasolle. Fluoresenssispektrometrissä UV/Vis-säteily virittää tutkittavan näytteen molekyylit ylemmälle elektroniselle tasolle ja laite detektoi viritystilan purkautuessa syntyvän säteilyn intensiteettiä aallonpituuden funktiona. Viritystila saadaan aikaan valon absorptiolla ja siinä käytetään ksenonlampua, josta saadaan voimakas valointensiteetti. Viritysvalosta valitaan monokromaattorilla haluttu aallonpituus ja se ohjataan näytteeneseen. (Jaarinen & Niiranen 2015.) IFMA määityksissä näytteen signaali nousee pitoisuuden kasvaessa, kun taas FIA:ssa signaali laskee. IFMA-määityksessä edellyttää suurta antigeenin kokoa, jotta se pystyy sitomaan vähintään kaksi eri vasta-ainetta. FIA määitykselle on ominaista, että pienikin signaalitason muutos aiheuttaa suuren muutoksen pitoisuudessa ja sitä käytetäänkin pienimolekyylisten yhdisteiden, kuten steroidihormonien mittaukseen. (PerkinElmer 2016e.)

DELFLIA menetelmää voidaan käyttää vaihtoehtona perinteisen entsyymi-immunologisen menetelmän eli ELISA:n sijasta (PerkinElmer 2015a). ELISA:ssa antigeeniin tai vasta-aineeseen on liitetty entsyymileima, joka hajottaa lisätyn substraattiliuoksen fotometrisesti mitattavaksi yhdisteeksi (Åkerman 2010). Verrattuna perinteiseen ELISA menetelmään DELFLIA immunologisessa menetelmässä eli DELFLIA ELISA:ssa, entsyymien käyttö ei ole välttämätöntä signaalin tuottamiseksi (Kuva 3.) (PerkinElmer 2015a). DELFLIA:ssa käytetään lantanoidien kelaatteja, kuten Europiumia (Eu) fluoresoivina merkkiaineina (PerkinElmer 2015b). Kelaatit ovat orgaanisia yhdisteitä, jotka pystyvät sitomaan useammalla sidoksella yhden metalli atomin muodostaen rengasmaisen rakenteen (Peda 2017). DELFLIA:ssa voidaan lisäksi mitata useampaa analyyyttiä kerrallaan käyttämällä useampaa leimaa samanaikaisesti (PerkinElmer 2015a).



Kuva 3. ELISA ja DELFIA menetelmän vertailu (PerkinElmer 2015a).

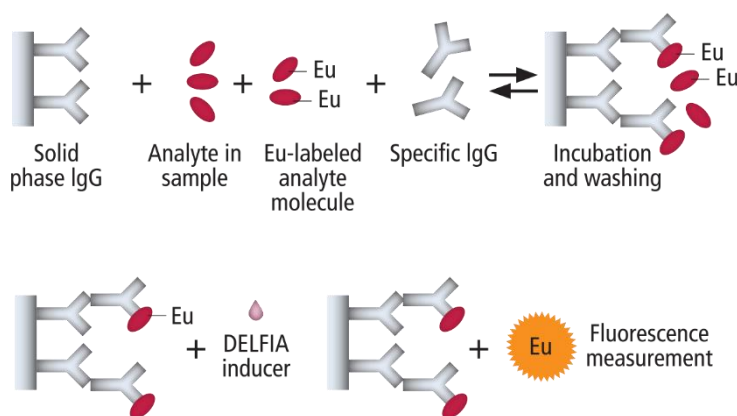
3.2 DELFIA®/ AutoDELFIATM Neonatal 17 α – OH-progesterone analyysi

DELFIA analyysissä käytetään vasta-aineella päällystettyjä levyjä. Analyysi on suunniteltu havainnoimaan näytteessä esiintyvän yhdisteen tai biomolekyylin käyttämällä lantanoidin kelaatilla leimattua merkkiainetta ja erottelemalla sitoutumattomat merkkiaineet pesuvaiheiden avulla. Näiden lantanoidien kelaattien fluoresenssin kesto on paljon pidempi kuin perinteisten kemiallisten fluoroisovien molekyylien (fluoroforien), joka mahdollistaa tehokkaan hetkellisen resoluution käytön autofluoresoivan taustan pelkistyessä. Laaja Stokesin siirtymä (ero virityksen ja emission aallonpituuksissa) ja ohut emissio piikki mahdollistaa korkean signaali-kohinasuhteen. Herkkyys on vieläkin korkeampi dissosiaatio-mittausperiaatteen vuoksi. Europium dissosioituu mittaliuokseen ja uusi voimakkaasti fluoroisoiva kelaatti muodostuu suojaavaan liuokseen. DELFIA:n lantanoidien kelaatit vaativat toimiakseen edellä kuvatun liukenemismuodonmuutoksen fluoresoidakseen. Tämä saadaan aikaa käyttämällä DELFIA mittaliuosta. (PerkinElmer 2015b.)

Lantanoidi-leimattuja immunoreagensseja voidaan käyttää ei-kilpailevassa (sandwich mallisessa) ja kilpailevassa aikaeroitteisessa fluoresenssi tekniikoissa. Menetelmän suunnittelu riippuu analyyttien ja vasta-aineiden vaatimista herkkyyksistä ja dynaamisesta alueesta eli pienimmän ja suurimman mitattavan signaalin välisestä alueesta. Kilpailevassa menetelmässä Europium leimattu analyytti, joka on tunnettu, kilpailee näytteessä mahdollisesti olevien analyyttien kanssa. (PerkinElmer 2015a.) 17 α -OHP määrittäminen on kilpaileva aikaeroitteinen fluoroimmunomääritys (FIA). Määritys perustuu kilpailevaan sitoutumiseen Europium-leimatun 17 α -OHP antigeenin ja näytteen sisältämän 17 α -OHP antigeenin välillä sekä rajalliseen määrään spesifistä polyklonaalista 17 α -OHP IgG

vasta-ainetta (Kuva 4.). Kaksoisvasta-aine, joka tunnistaa spesifisen IgG vasta-aineen on kiinnitetty kiinteään faasiin, joka tässä työssä on kuoppalevyn (mikrotiitterilevyn) seinämä (PerkinElmer 2015a; PerkinElmer 2016d).

Näytteen sisältämä antigeeni kilpailee siis leimatun antigeenin kanssa. Inkubaatioajan jälkeen pestään pois sitoutumattomat analyytit ja vain sitoutuneet immunokompleksit jäävät kiinni kuoppalevyn kaivoihin. Mittaliuos liuottaa Europium leiman antigeenista liuokseen missä se muuttuu voimakkaasti fluoresoivaksi kelaatiksi reagoidessaan mittaliuoksen sisältämien molekyylien kanssa. Tämän jälkeen Europiumin fluoresenssi mitataan jokaisesta kaivosta käyttämällä aikaeroitteista fluorometria (TRF). Fluoresoiva signaali on kääntäen verrannollinen analyytin pitoisuuteen näytteessä. (PerkinElmer 2015a.)



Kuva 4. 17α-OHP menetelmäperiaate (PerkinElmer 2016d).

3.3 Referenssimateriaalien käyttö tasalaatuisten kittierien tuotannossa

PerkinElmer käyttää referenssimateriaaleja AutoDELFLIA®/DELFLIA® Neonatal 17α-hydroxyprogesterone kittierien tuotannossa, joiden avulla pyritään minimoimaan kittierien välisiä muutoksia (PerkinElmer 2016e). Vertailumateriaali eli referenssimateriaali on homogeeninen aine, jossa yhden tai useamman analyytin pitoisuus on tunnettu niin, että materiaalia voidaan käyttää mittauslaitteen tai mittausmenetelmän arviointiin ja materiaalien määrittämiseen (Jaarinen & Niiranen 2005). Referenssimateriaalin tulee olla määriteltujen ominaisuuksien osalta stabiili, jotta se täyttää käyttötarkoituksen asettamat vaatimukset mittauksessa. Varmennetun vertailuaineen eli sertifioidun referenssimateriaalin mukana on toimivaltaisen tahon antama dokumentaatio, jonka avulla saadaan pätevillä

menettelyillä yksi tai useampi määritelty ominaisuuden arvo sekä vastaavat epävarmuudet ja jäljitettävyydet. (MIKES 2011.) Ideaalinen vertailumateriaali olisi sertifioitu ja mahdollisimman samankaltainen tutkittavan analyytin kanssa, mutta niiden saatavuus on usein rajoitettua. Sertifioidut referenssimateriaalit ovat kalliita ja kaikkiin tarkoituksiin ei ole saatavilla kaupallista valmistetta. Tällöin voidaan itse valmistaa referenssimateriaali lisäämällä omaan näytematriisiin (eli ympäristöön) sertifioidun pitoisuuden omaavaa analyyttiä. (Jaarinen & Niiranen 2005; MIKES 2011.)

Käytännön tarkoituksiin on oltava referenssimateriaali, jossa analyytin pitoisuus, sen tarkkuus ja matriisi vastaavat käyttökohdetta ja menetelmälle asetettuja luotettavuustavoitteita (Jaarinen & Niiranen 2005). Mittauksen todenmukaisuus, joka ilmaistaan usein poikkeamana, määritetään vertaamalla menetelmällä saatuja mittaustuloksia tunnettuun referenssiarvoon, joka on saatu vertailumateriaalista tai toisen tunnetun menetelmän avulla. Mittaustuloksista saadaan vertailukelpoisia, kun kaikki yksittäiset mittaustulokset on yhdistetty johonkin yhteisesti tunnettuun stabiiliin vertailumateriaaliin tai mittanormaaliiin. Tällöin tuloksien luotettavuutta voidaan arvioida kyseisen vertailumateriaalin tai mittanormaalien suhteen ja näin muodostuu jäljitettävyyshetket tunnettuine mittauserävarmuusarvioineen. (MIKES 2011.) Mittauksen todenmukaisuutta voidaan tutkia myös osallistamalla laboratorioden välisiin vertailumittauksiin ja referenssimateriaalien käyttö mahdollistaa eri menetelmien tuottamien tulosten vertailtavuuden sekä laboratorion sisällä että eri laboratorioden välillä (Jaarinen & Niiranen 2005; MIKES 2011).

Molekyylien mittaaminen biologisissa nesteissä immunologisilla menetelmillä on riippuvainen näytteen vertailusta kalibraattoriin, joka tunnetaan referenssimateriaalina tai standardina. Esimerkiksi proteiinimittaukset pitää kalibroida korkeasti puhdistettuja proteiineja vasten, joiden molekyyliominaisuudet ovat samanlaisia kuin biologisissa nesteissä. Kansainvälisesti tunnettujen primääristen vertailumateriaalien käyttö näissä määrittelyissä on välttämätöntä. Useimmissa tapauksissa matriisipohjaiset kalibraattorit ovat suotavia, koska ne suurella todennäköisyydellä käyttäytyvät samalla tavalla kuin näytteet samassa matriisissa. Referenssimateriaalin ominaisuuksien tulisi olla mahdollisimman samankaltaisia kuin analyytin luonnollisessa ympäristössä, joka usein on ihmisen seerumia tai plasmaa. (Whicher 1998.)

3.4 Tasokalibraattorien käyttö referenssimateriaaleina

Primääristen kalibraattorien tuotanto on huomattavan kallista ja kerran tuotettuna niistä tulee hyvin arvokas resurssi, jota on vaikea korvata. Tämä on monesti ratkaistu organisaatioissa tuottamalla sekundaarinen referenssimateriaali, joka on kalibroitu primaarista referenssimateriaalia vasten. (Whicher 1998.) Wallac Oy:n tasokalibraattorit valmistetaan vasten käyränmuotokalibraattoreita, jotka ovat puolestaan valmistettu primäärisiä kalibraattoreita vasten. Primäärisen kalibraattorin avulla varmistetaan kalibroinnin jäljitettävyyssketju. Se valmistetaan kansainvälisesti hyväksytystä referenssimateriaalista, silloin kun sellainen on saatavilla. (PerkinElmer 2016e.)

Kittikalibraattoreiden eli standardien kalibroinnissa käytetään tasokalibraattoreita referenssimateriaaleina, joiden pitoisuudet tunnetaan tarkasti. (PerkinElmer 2016e.) Referenssimateriaalista valmistetaan eri väkevyisiä liuoksia ja niiden avulla määritetään mittaussignaalin tason ja analyytin pitoisuuden välinen yhteys eli kalibrointikäyrä. Tulosten oikeellisuuden varmistamiseksi kalibrointiliuokset joudutaan usein valmistamaan näytteen kaltaiseksi eli niihin lisätään analysoitavien aineiden ohella näytetaustan komponentteja. (Jaarinen & Niiranen 2005.) Näytematriisi pyritään siis valitsemaan siten, että se on mahdollisimman yhdenmukainen näytteiden kanssa eli pyritään siihen, että tasokalibraattori on mahdollisimman näytteenkaltaisen. Tasokalibraattorin pitoisuudet valitaan siten, että ne kattavat kliinisesti merkittävän mittausalueen riittävän laajasti. (PerkinElmer 2016e.) Kalibrointiliuokset uusitaan määrääjoin ja uusinnan yhteydessä tarkastetaan, että uusilla ja vanhoilla liuoksilla saadaan yhteneviä tuloksia. Kalibroinnin pysyvyyttä ja tulosten luotettavuutta varmennetaan myös laaduntarkkailunäytteillä eli kontrollinäytteillä (Jaarinen & Niiranen 2005).

Tasokalibraattoria käytetään loppulaadunvalvonnassa eräkohtaisten kittikalibraattoreiden eli standardien loppupitoisuuden määrittämisessä. Standardeja valmistettaessa niiden alustavat pitoisuudet määritetään käyränmuotokalibraattoria tai primäärikalibraattoria vasten. Loppulaadunvalvontatestillä testataan tuotannossa hyväksytyjen reagenssien toimivuus yhdessä sekä annetaan standardeille lopulliset eräkohtaiset pitoisuudet. Standardit muodostavat kalibraattorikäyrän, jota vasten lasketaan kittierästä riippumattomat QA-kontrollien pitoisuudet, kittikontrollit sekä asiakkaiden seulontanäytteet. (PerkinElmer 2016e.)

4 OPINNÄYTETYÖN TARKOITUS, TAVOITE JA TUTKIMUSONGELMAT

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena on kehittää menettelyä, jolla Wallac Oy:n referenssimateriaalien uudet erät otetaan käyttöön. Opinnäytetyössä kehitetään AutoDEL-FIA/DELFI[®] B/A024 Neonatal 17 α -OHprogesterone -kittien loppulaadunvalvonnassa käytettävien Neonatal 17 α -OHprogesterone –tasokalibrattoreiden uuden erän käyttöönottoon liittyviä tulosten analysointia ja käsittelyä. Uusi referenssimateriaalierä, kuten tasokalibraattori, valmistetaan ja niiden pitoisuudet määritetään työohjeiden mukaisesti. Määrityksessä saadut pitoisuustulokset analysoidaan validoidulla laskentakavalla ja lopputuotteen pitoisuustason säilyttämiseksi uuden erän pitoisuustuloksia verrataan voimassa olevan erän pitoisuuksiin. Tämän vertailun perusteella asetetaan uudelle referenssimateriaalierälle (tässä työssä tasokalibraattorierälle) tavoitepitoisuudet ja niille lasketaan edelleen tuotteiden loppulaadunvalvonnassa tarvittavat tasokalibrattoreiden hyväksyntärajat.

Tämän opinnäytetyön tavoite on, että kehitetyt toimenpiteet voidaan jatkossa ottaa käyttöön muidenkin analyyttien referenssimateriaalien uusille erille. Tasokalibrattoreiden avulla minimoidaan tuotteiden loppulaadunvalvonnassa eri tuote-erien välistä tason vaihtelua. Laadukkaan tuotteen avulla havaitaan vastasyntyneen aineenvaihduntasairaus ennen oireiden alkua ja hoito voidaan aloittaa ajoissa. Vakavien aineenvaihduntasairauksien ennaltaehkäisy on yhteiskunnalle edullisempaa kuin sairauksien hoito ja lapsikuolleisuuden vähentäminen on seulonnalle riittävä peruste. Lisäksi seulontakeskusten väärin positiivisten tulosten määrää minimoimalla saadaan seulonnasta kustannustehokkaampaa.

Tutkimusongelmat

1. Muuttuuko kittikalibraattorin taso uuden tasokalibraattorin käyttöönotossa?
2. Poikkeako uuden tasokalibraattorin taso referenssikalibraattorista?
3. Onko analysaattoreiden ja menetelmän välillä merkittävää tulotason vaihtelua?

5 KÄYTÄNNÖN TOTEUTUS JA TILASTOLLINEN KÄSITTELY

5.1 Opinnäytetyön toteutus

Opinnäytetyön aihe on saatu Wallac Oy:lta syksyllä 2016. Opinnäytetyötä varten tehtiin Turun ammattikorkeakoulun toimeksiantosopimus Wallac Oy:n kanssa, joka vastasi opinnäytetyön kokeelliseen osaan kuuluvista kustannuksista. Käytännön toteutus tehtiin joulukuussa 2016 kahden viikon aikana Wallac Oy:n loppulaadunvalvonnan laboratoriossa. Opinnäytetyön tekijä perehtyi tänä aikana myös manuaalimääritysmenetelmään (DELFIÄ), josta suoritettiin vaadittava näyttö Wallac Oy:n perehdytyskäytännön mukaisesti. Tämän jälkeen tehtiin opinnäytetyöhön kuuluva yksi manuaalimääritys DELFIA menetelmällä. Tulokset käsiteltiin keväällä 2017 Combination Test- ohjelmistolla ja tulokset taulukoitiin Excel – tiedonkäsittelyohjelmalla opinnäytetyötä varten. Wallac Oy sai tulosten perusteella yleisen menettelyohjeen uuden referenssimateriaalierän käyttöön- otosta. Valmis opinnäytetyö raportoitui keväällä 2017.

Tässä työssä 17 α -OHP pitoisuutta mitattiin DELFIA – teknologian avulla. Aineisto valittiin ohjaajien toimesta. Aineistona käytettiin AutoDELFIÄ® Neonatal 17 α -OH-progesterone (B024-112) – kittejä, DELFIA® Neonatal 17 α -OH-progesterone (A024-112) – kittiä, QA kontrolleja, uuden erän ja käytössä olleen erän (referenssikalibraattori) tasokalibraattoreita. Tasokalibraattorikasettien veritäplistä rei'itettiin neljä rinnakkaista näytettä jokaisesta viidestä eri tasosta kuoppalevyille. Jokaiselle kuoppalevyille oli oma kasettinsa ja kasetit olivat valittu satunnaisesti tasokalibraattorierästä. Testattavia kasetteja oli yhteensä 20 kappaletta. Toteutuksessa tehtiin kaksi AutoDELFIÄ määritystä neljällä eri AutoDELFIÄ® Neonatal 17 α -OH-progesterone (B-024) kitillä työohjeiden mukaisesti ja yksi DELFIA määritys yhdellä DELFIA® Neonatal 17 α -OH-progesterone (A024-112) – kitillä.

5.2 DELFIA määritys

DELFIÄ määrityksessä käytettiin hyväksyttyä DELFIA® Neonatal 17 α – OH-progesterone (A024-112)-kittiä, joka sisälsi osan työssä tarvittavista reagensseista (Kuva 5). Kittipakkaus sisältää vasta-aineella päällystetyt kuoppalevyt, kittikalibraattorikasetit (stan-

dardit), kittikontrollikasetit, leima- ja vasta-ainepullot sekä puskuri-, pesu- ja mittaliuoksen. Lisäksi määrittäksessä oli mukana kittierästä riippumaton QA-kontrolli, uuden erän tasokalibraattori sekä käytössä oleva tasokalibraattori, joka toimi referenssikalibraattorina tässä työssä.



Kuva 5. DELFIA® Neonatal 17α – OH-progesterone kitti (PerkinElmer 2016c).

Kokeellinen osuus suoritettiin loppulaadunvalvontatestin työohjeiden mukaisesti. Poikkeuksena oli, että DELFIA määrittäminen tehtiin käyttäen neljää levyä kahdeksan sijaan. Toisena poikkeuksena oli, että rei'ityskaavioon lisättiin referenssitasokalibraattoreiden tilalle uuden erän tasokalibraattorit, jotka toimivat referenssikalibraattoreina tässä työssä. Uuden erän ja referenssikalibraattoreiden pitoisuudet määritettiin siis samanaikaisesti. Määrittäksessä reagenssien annettiin lämmitetty huoneenlämpöiseksi, jonka jälkeen kasettien veritäplät rei'itettiin Puncher -laitteella neljälle kuoppalevyille rei'ityskaavion mukaisesti. Kylmäkuivattu leima liuotettiin ja pesuliuos laimennettiin ohjeiden mukaisesti. Manuaalimäärittäksessä tehtiin lisäksi jokaiselle levyille antiseerumilaimennus sekä leimalaimennos työohjeiden mukaisesti puskuriin laimennettuna. Rei'itetyille näytteen sisältäville kuoppalevyille pipetoitiin antiseerumilaimennosta ja antiseerumin annettiin kiinnittyä ravistelijassa kuoppalevyn vasta-aineisiin. Tämän jälkeen kuoppiin pipetoitiin leimalaimennos, jossa leima on kiinnittynyt näytteen sisältämän antigeenin kanssa kilpailemaan antigeeniin. Leimalaimennoksen annettiin sekoittua levyille ravistelijassa. Kaksi levyä inkuboitiin kolmen tunnin ajan ja kaksi puolestaan yön yli. Inkubointien aikana antigeenit kilpailivat sitoutumisesta vasta-aineisiin. Näytetäplät liuoksineen poistettiin Disk

Removerilla kuopista ja stripsit pestiin Plate Washer -laitteella ohjeiden mukaisesti. Pesussa ylimääräiset sitoutumattomat antigeenit huuhtoutuvat pois. Kuoppiin lisättiin mittausliuos mittaliuosannostelijalla ja sen annettiin inkuboitua ravistelijassa. Aikaerotteinen fluoresenssi mitattiin PerkinElmerin VICTOR TM X-laitteella. Mitatut signaalit tulostettiin Reader Counts – listana. Tarvittavat tiedot syötettiin Combination Test -ohjelmistolla, joka analysoi tulokset.

5.3 AutoDELFIA määrittäminen

Työn kokeellisessa osuudessa tehtiin kaksi AutoDELFIA (Kuva 6.) määrittäystä neljällä eri AutoDELFIA® Neonatal 17 α -OH-progesterone (B-024-112) kitillä. B-024-112 kitti sisältää tarvittavat reagenssit lukuun ottamatta pesu- ja mittaliuosta. Lisäksi työssä käytettiin kittierästä riippumattomia QA kontrolleja sekä uuden ja käytössä olleen erän tasokalibraattoreita. Työ tehtiin loppulaadunvalvontatestin ohjeita noudattaen. Poikkeuksellisesti tässä työssä yhdellä määrittäyskerralla ajettiin samanaikaisesti kaksi eri kittierää yhden sijaan. Toisena poikkeuksena oli, että pipetointikaavioon lisättiin referenssitasokalibraattoreiden tilalle uuden erän tasokalibraattorit, jotka toimivat referenssikalibraattoreina tässä työssä. Uuden erän ja referenssikalibraattorin pitoisuudet määritettiin siis samanaikaisesti.

AutoDELFIA määrittäyksessä kasettien veritäplät rei'itettiin Puncher -laitteella neljälle kuoppalevyille rei'ityskaavion mukaisessa järjestyksessä. Näytteet analysoitiin eri AutoDELFIA laitteilla siten, että kaksi levyä kustakin kitistä asetettiin laitteisiin ja samanaikaisesti käynnistettiin kaksi AutoDELFIA laitetta. Määrittäykset toteutettiin peräkkäisinä päivinä ja niitä oli yhteensä kaksi kertaa. Laitteet koostuvat näytteiden prosessointiyksiköstä ja näytelevyjen prosessointiyksiköstä (Kuva 6.). Analyytikä teki kaikki DELFIA -menetelmän työvaiheet: näytteiden ja reagenssien annostelun, kuoppalevyjen pesun, fluoresenssimittaukset ja mittaus tulosten laskemisen automaattisesti (Åkerman 2010). Kylmäkuivattu leima liuotettiin ja pesuliuokset laimennettiin ohjeiden mukaisesti. Laitteeseen asetettiin tarvittavat puskuri-, leima-, mittaliuos- ja antiseptikumipullot sekä pesuliuokset. Mitatut tulokset siirrettiin Combination Test ohjelmistoon.



Kuva 6. AutoDELFIA laite (PerkinElmer 2016a).

5.4 Tilastollinen käsittely

Aineistona käytettiin otosta uudesta tasokalibraattorierästä. Otoksen avulla pyritään tekemään johtopäätöksiä koko perusjoukosta. Muuttujien arvoissa oleva informaatio voidaan pelkistää muutamaaan muuttujaa kuvaavaan tunnuslukuun. Tässä työssä valittiin tunnusluvuista aritmeettinen keskiarvo, keskihajonta, alue eli maksimin ja minimin erotus, minimi, maksimi ja otoskoko kuvaava lukumäärä. Tunnuslukuihin valittiin myös 95 %:n luotettavuustaso eli luotettavuusväli (Kaava 1.).

Otoksesta lasketut arvot ovat vain perusjoukon vastaavien arvojen arvioita, joihin liittyy tietty epävarmuus. Luottamusväli ilmoittaa välin, jolla perusjoukon suure tietyllä todennäköisyydellä sijaitsee, kun sitä arvioidaan otoksesta laskettujen arvojen perusteella. (Heikkilä 2014.) Luottamusväli ilmaisee satunnaisotoksesta laskettuihin lukuihin sisältyvän virhemarginaalin. Otoksesta arvioidun tunnusluvun, kuten esimerkiksi keskiarvon,

molemmille puolille voidaan laskea 95 %:n virhemarginaalit. (Tilastokeskus 2017.) Keskiarvon 95 %:n luottamusvälin kaavassa normaalijakaumaa käytettäessä perusjoukon (X) luottamusväli saadaan lisäämällä ja vähentämällä siitä kriittinen arvo 1,96 joka kerrotaan keskihajonnalla (σ), joka puolestaan on jaettu otoskoon (n) neliöjuurella.

$$X \pm 1,96 \times \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

Kaava 1. Keskiarvon 95 %:n luottamusvälin kaava (Heikkilä 2014).

Combination Test – ohjelmisto laskee samanaikaisesti määritettyjen eri kuoppalevyjen tasokalibraattoreiden pitoisuuksista trimmatun keskiarvon tasokohtaisesti. Trimmattu keskiarvo on laskettu aineistosta sen jälkeen, kun siitä on ensin poistettu 5 % suurimista ja pienimmistä havainnoista (TAK 2014). Trimmauksen tarkoituksena on poistaa mitatuista pitoisuuksista satunnaisten mittausvirheen aiheuttamia poikkeavia pitoisuuksia, jotka muuten vääristäisivät aineistosta laskettuja tunnuslukuja (Huber 1981, ks. Soukka 2011).

5.5 Metodologiset lähtökohdat

Määrällinen eli kvantitatiivinen tutkimus on menetelmä, joka antaa yleisen kuvan mitattavien ominaisuuksien eli muuttajien välisistä suhteista ja eroista. Kvantitatiivisessa menetelmässä tutkittua tietoa tarkastellaan numeerisesti tunnuslukuja apuna käyttäen sekä kuvataan sanallisesti miten asiat liittyvät toisiinsa tai eroavat toistensa suhteen. (Vilka 2007.) Kokeellisessa eli eksperimentaalisessa tutkimuksessa mitataan yhden muuttujan vaikutusta toiseen muuttujaan. Tyypillistä kokeellisessa tutkimuksessa on, että kohdenetusta joukosta eli populaatiosta valitaan näyte, joka analysoidaan erilaisten koejärjestelyiden valossa, harkitusti ja systemaattisesti olosuhteita muunnellen. (Hirsjärvi ym. 2004.)

Kvantitatiivissa tutkimuksessa on keskeistä johtopäätökset aiemmista tutkimuksista ja teorioista. Kvantitatiivisessa tutkimuksessa teoreettisilla käsitteillä on keskeinen rooli ja ne muodostuvat järjestelmällisen tutkimustyön tuloksena. Käsitteet ovat laaja-alaisia ja toimivat siten uusien teorioiden ja käsitteiden muodostuksessa. (Hirsjärvi ym. 2004; Vilka 2007.) Määrällisessä tutkimusprosessissa tutkimuksessa edetään teoriasta käy-

täntöön. Tämän jälkeen palataan takaisin käytännöstä teoriaan analyysin, tulosten ja tulkinnan avulla. (Vilkkä 2007.) Oleellista on myös aineiston valinta ja aineistonkeruun suunnitelma. Tutkimustulokset mitataan numeerisesti, taulukoidaan ja käsitellään tilastollisesti. Päätelemät perustuvat tilastollisesti käsiteltyihin tuloksiin. (Hirsjärvi ym. 2004.)

Määrällinen tutkimus on kiinnostunut luokittelusta sekä syy – seuraus-suhteista ja siksi siinä käytetään usein vertailevaa ja selittävää tutkimustapaa (Anttila 2005). Vertailevan tutkimuksen tavoitteena on ymmärtää paremmin tarkasteltavaa asiaa kahden tai useamman muuttujan avulla sekä tuoda selkeämmin esille asioiden välisiä eroja (Vilkkä 2007). Määrällinen yleinen tai yleistettävä tieto on kriteereiltään tilastollis-matemaattista ja tieto käsitellään tilastollisina yksikköinä, jotka perustuvat käsitteisiin tilastoyksikkö, otos ja näyte (Anttila 2005).

Tämä opinnäytetyö on kvantitatiivinen. Teoreettinen viitekehys nojaa aikaisempiin tutkimuksiin ja käsitteiden määrittelyyn. Kokeellisen osuuden analysoinnit mitataan numeerisesti ja tulokset analysoidaan käyttämällä tilastollisia menetelmiä.

5.6 Eettiset lähtökohdat

Tutkijan ammattietiikka tarkoittaa hyvää tieteellistä tapaa, jota tutkijan tulee tutkimuksen toteutuksessa noudattaa (Vilkkä 2007). Tutkimusaiheen valinta on ensimmäinen eettinen ratkaisu, joka tutkijan tulisi ottaa huomioon (Hirsjärvi ym. 2004). Tutkimusetiikan noudattaminen onkin tutkijan velvollisuus. Se määrittää tutkimustyötä koskevat pelisäännöt suhteessa muihin (kollegat, kohde, rahoittaja, toimeksiantaja, yleisö) ja siihen kuuluu eettiset periaatteet, kuten normit, arvot ja hyveet. Tieteellinen tutkimus voi olla eettisesti hyväksyttävää ja luotettavaa, jos tutkimus on suoritettu hyvän tieteellisen käytännön edellyttämällä tavalla. Myös tulokset ovat tällöin uskottavia. (TENK 2012.) Tutkimuksessa noudatetaan hyviä tieteellisiä käytäntöjä, kuten yleistä huolellisuutta, tarkkuutta ja rehellisyyttä. (Vilkkä 2007.) Lisäksi tutkimustyössä vältetään epärehellisyyttä kaikissa sen osavaiheissa. Tämä tarkoittaa sitä, että toisen tekstiä ei plagioida, tuloksia ei yleistetä kriittikömmästi ja raportointi ei saa olla harhaanjohtavaa tai puutteellista. (Hirsjärvi ym. 2014.) Myös tutkimusaineisto kerätään ja käsitellään luottamuksellisesti sekä lähdeviitteet merkitään työhön asiaan kuuluvalla tavalla (Vilkkä 2007).

Opinnäytetyön toteutuksesta on sovittu Wallac Oy:n kanssa ja erillistä tutkimuslupaa ei vaadita, mutta Turun ammattikorkeakoulun kanssa tehtiin toimeksiantosopimus opinnäytetyön toteutuksesta. Toimeksiantosopimuksen liitteenä on Wallac Oy:n selvitys tietojen luovutuksesta ja salassapidosta. Tutkimus on toteutettu salassapitosopimusta noudattaen ja toimeksiantajan tietosuojasta huolehtien. Aiheen valinnassa otettiin huomioon asiakkaiden eli tässä tapauksessa seulontakeskusten laboratorioiden asiakastyytyväisyys. Työn kokeellinen osuus dokumentoitiin työn aikana työohjeiden mukaisesti ja tutkimuksen teossa käytettiin hyviä tieteellisiä käytäntöjä. Työssä ei käytetty potilasnäytteitä vaan käytettävät materiaalit olivat kaupallisia valmisteita. Saatua aineistoa käsiteltiin luottamuksellisesti ja tulokset siirrettiin ohjelmistosta toiseen erityistä huolellisuutta käyttäen. Opinnäytetyö raportoitiin tieteelliselle tiedolle asetettujen vaatimusten mukaisesti. Opinnäytetyön valmistuessa toimeksiantaja sai käyttöönsä yleisen ohjeistuksen referenssimateriaalin uuden erän käyttöönotosta. Yleinen ohjeistus nopeuttaa ja yhtenäistää tulosten käsittelyä Wallac Oy:ssä.

6 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU

6.1 Uuden tasokalibraattorierän vaikutus kittikalibraattoreiden pitoisuuksiin

AutoDELFIÄ määrittäessä ja Combination Test – ohjelmistolla käsiteltujen standardien (S1-S6) pitoisuudet taulukoitiin Excel -tiedonkäsittelyohjelmalla (Taulukko 1). Standardit on määritetty uuden erän tasokalibraattoria (Taso A) sekä käytössä olevan erän (Taso B) tasokalibraattoria vasten ja näiden prosentuaalinen erotus on laskettu Excel – tiedonkäsittelyohjelmalla. Taulukon 1. tuloksia tarkastellessa huomataan, että Taso A ei poikkea juurikaan Tasosta B. Prosentuaaliset erot ovat suurimmillaan pienillä ja suurilla pitoisuuksilla, mikä on immunokemiallisissa määrittäyksissä tyypillistä. Kittierien välillä ei myöskään ole suurta vaihtelua.

Taulukko 1. Standardien pitoisuudet (ng/ml) ja prosentuaalinen erotus eri tasokalibraattori erien välillä.

Kitti 2	Taso A	Taso B	Ero
S1	0,0	0,0	
S2	4,0	4,0	0 %
S3	9,9	10,0	1 %
S4	25,9	26,4	2 %
S5	78,0	80,4	3 %
S6	225,0	233,0	4 %

Kitti 4	Taso A	Taso B	Ero
S1	0,0	0,0	
S2	3,6	3,8	6 %
S3	10,0	10,3	3 %
S4	24,9	25,6	3 %
S5	78,8	77,7	-1 %
S6	251,0	237,0	-6 %

Kitti 1	Taso A	Taso B	Ero
S1	0,0	0,0	
S2	3,5	3,7	6 %
S3	9,2	9,5	3 %
S4	23,2	23,7	2 %
S5	72,8	72,3	-1 %
S6	243,0	236,0	-3 %

Kitti 3	Taso A	Taso B	Ero
S1	0,0	0,0	
S2	3,3	3,6	9 %
S3	9,1	9,6	5 %
S4	22,9	23,5	3 %
S5	73,1	73,1	0 %
S6	236,0	229,0	-3 %

6.2 Ero uuden tasokalibraattorierän ja referenssikalibraattorierän välillä

AutoDELFIÄ:lla mitatut uuden tasokalibraattorierän pitoisuudet taulukoitiin käsin Excel-tiedonkäsittelyohjelmalla Combination Test – ohjelmiston raporteista kittieräkohtaisesti (Kitit 1-4) (Taulukko 2.). Tasokalibraattorien pitoisuutta mitattiin viidellä eri tasolla (Tasot 1-5) ja kuudellatoista eri levyllä.

Taulukko 2. Uuden tasokalibraattorierän mitatut pitoisuudet (ng/ml) kittierillä 1-4 kuoppa-levykohtaisesti.

Kitti 1.	Levy A	Levy B	Levy C	Levy D
Taso 1	3,8	3,9	4,1	4,6
Taso 2	8,9	9	10,1	10
Taso 3	22,5	23,5	24,9	24,5
Taso 4	76,7	74	72,1	80,6
Taso 5	255	228	235	229

Kitti 3.	Levy I	Levy J	Levy K	Levy L
Taso 1	3,9	3,9	3,7	3,5
Taso 2	9,7	9,8	9,6	11
Taso 3	25,7	23,7	24,8	26,5
Taso 4	75,6	75,2	70,7	70
Taso 5	243	237	227	218

Kitti 2.	Levy E	Levy F	Levy G	Levy H
Taso 1	3,9	3,5	3,7	4,2
Taso 2	9,7	9,1	9,4	10,3
Taso 3	24,1	27,6	26	24,6
Taso 4	73	79,6	73,8	73,5
Taso 5	219	234	224	236

Kitti 4.	Levy M	Levy N	Levy O	Levy P
Taso 1	4,1	4,2	4	4,2
Taso 2	9,7	9,6	10,1	9,3
Taso 3	23,5	26,5	22,7	22,7
Taso 4	78	74,8	69,3	72,7
Taso 5	243	258	246	244

Taulukon 2. pitoisuuksista laskettiin seuraavat tunnusluvut kittieräkohtaisesti Taulukkoon 3. Keskihajonnan avulla saatiin tässä työssä merkitsevä 95 % luotettavuustaso lasketua. Keskihajonta on laskettu taulukossa 3. lasketun keskiarvon mukaan.

Taulukko 3. Tasokalibraattoreiden pitoisuuksien tunnusluvut kittikohtaisesti.

<i>Kitti 1.</i>					
<i>Tunnusluku</i>	<i>Taso 1</i>	<i>Taso 2</i>	<i>Taso 3</i>	<i>Taso 4</i>	<i>Taso 5</i>
Keskiarvo	4,1	9,5	23,9	75,9	236,8
Keskihajonta	0,4	0,6	1,1	3,7	12,6
Alue	0,8	1,2	2,4	8,5	27,0
Minimi	3,8	8,9	22,5	72,1	228,0
Maksimi	4,6	10,1	24,9	80,6	255,0
Lukumäärä	4	4	4	4	4
Luotettavuustaso(95 %)	0,6	1,0	1,7	5,9	20,0

<i>Kitti 2.</i>					
<i>Tunnusluku</i>	<i>Taso 1</i>	<i>Taso 2</i>	<i>Taso 3</i>	<i>Taso 4</i>	<i>Taso 5</i>
Keskiarvo	3,8	9,6	25,6	75,0	228,3
Keskihajonta	0,3	0,5	1,6	3,1	8,1
Alue	0,7	1,2	3,5	6,6	17,0
Minimi	3,5	9,1	24,1	73,0	219,0
Maksimi	4,2	10,3	27,6	79,6	236,0
Lukumäärä	4	4	4	4	4
Luotettavuustaso(95 %)	0,5	0,8	2,5	4,9	12,9

<i>Kitti 3.</i>					
<i>Tunnusluku</i>	<i>Taso 1</i>	<i>Taso 2</i>	<i>Taso 3</i>	<i>Taso 4</i>	<i>Taso 5</i>
Keskiarvo	3,8	10,0	25,2	72,9	231,3
Keskihajonta	0,2	0,7	1,2	2,9	11,0
Alue	0,4	1,4	2,8	5,6	25,0
Minimi	3,5	9,6	23,7	70,0	218,0
Maksimi	3,9	11,0	26,5	75,6	243,0
Lukumäärä	4	4	4	4	4
Luotettavuustaso(95 %)	0,3	1,0	1,9	4,7	17,5

<i>Kitti 4.</i>					
<i>Tunnusluku</i>	<i>Taso 1</i>	<i>Taso 2</i>	<i>Taso 3</i>	<i>Taso 4</i>	<i>Taso 5</i>
Keskiarvo	4,1	9,7	23,9	73,7	247,8
Keskihajonta	0,1	0,3	1,8	3,7	6,9
Alue	0,2	0,8	3,8	8,7	15,0
Minimi	4,0	9,3	22,7	69,3	243,0
Maksimi	4,2	10,1	26,5	78,0	258,0
Lukumäärä	4	4	4	4	4
Luotettavuustaso(95 %)	0,2	0,5	2,9	5,8	11,1

Combination Test- ohjelmistosta saadut uuden erän tasokalibraattorien trimmatut keskiarvot sekä referenssikalibraattorin trimmatut keskiarvot syötettiin käsin Excel – tiedonkäsittelyohjelmaan. Taulukossa 4. on esitetty nämä trimmatut keskiarvot. Tarkastellessa Taulukkoa 4 voidaan todeta, että uuden erän tasokalibraattorien trimmatut keskiarvot olivat lähellä referenssikalibraattorin trimmattuja keskiarvoja.

Taulukko 4. Tasokalibraattorien trimmatut keskiarvot.

Kitti 1	Uusi erä	Referenssi
K1	4	3,8
K2	9,5	9
K3	24	22
K4	75,3	73,2
K5	232	226

Kitti 3	Uusi erä	Referenssi
K1	3,8	3,9
K2	9,7	9,1
K3	25,2	24,8
K4	73	77,9
K5	232	236

Kitti 2	Uusi erä	Referenssi
K1	3,8	3,7
K2	9,6	9
K3	25,3	25
K4	73,7	71,5
K5	229	221

Kitti 4	Uusi erä	Referenssi
K1	4,2	3,9
K2	9,7	9,3
K3	23,1	24
K4	73,7	76,5
K5	245	249

Taulukossa 5. on laskettuna uuden erän trimmattujen keskiarvojen 95 % luottamusvälit edellä esitettyjen 95 %:n luottamustasojen perusteella (Taulukko 4.) ja esitetty samanlaisesti määritettyyn referenssikalibraattorin tulokset eli referenssiarvot tasokohtaisesti (tasot K1-K5). Luottamusvälin sisällä olevat tulokset ovat vihreällä ja poikkeavat tulokset punaisella. Taulukossa 5. esitettyjä laskettuja arvoja verrattaessa tasokohtaisesti suurin osa tuloksista osuu määritetyille 95 %:n luottamusvälille. Poikkeavat tulokset ovat referenssikalibraattorin Kitti 1:sen Taso K3, joka poikkeaa 0,3 ng/ml, Kitti 3:sen Taso K4, joka poikkeaa 0,2 ng/ml ja Kitti 4:sen Taso K1, joka poikkeaa 0,3 ng/ml. Näin pienet poikkeamat eivät ole kliinisesti merkittäviä.

Taulukko 5. Uuden erän tasokalibraattorin vertailu referenssikalibraattoriin 95 % luottamusväliä käyttäen.

Kitti 1.			Kitti 2.		
Taso	Luottamusväli	Referenssiarvo	Taso	Luottamusväli	Rereferenssiarvo
K1	3,4 -4,6	3,8	K1	3,3 -4,3	3,7
K2	8,5 -10,5	9	K2	8,8 -10,4	9
K3	22,3 -25,7	22	K3	22,8 -27,8	25
K4	69,4 -81,2	73,2	K4	68,8 -78,6	71,5
K5	212 -252	226	K5	216,1 -241,9	221

Kitti 3.			Kitti 4.		
Taso	Luottamusväli	Referenssiarvo	Taso	Luottamusväli	Rereferenssiarvo
K1	3,5 -4,1	3,9	K1	4,0 -4,4	3,9
K2	8,7 -10,7	9,1	K2	9,2 -10,2	9,3
K3	23,3 -27,1	24,8	K3	20,2 -26,0	24
K4	68,3 -77,7	77,9	K4	67,9 -79,5	76,5
K5	214,5 -249,5	236	K5	233,9 -256,1	249

6.3 Analysointien ja menetelmien välinen ero

Combination Test – ohjelmistolla saadut tasokalibraattoreiden tasojen rinnakkaiset (K1-K5) arvot taulukoitiin laitekohtaisesti (Taulukko 6.) ja laskettiin näiden keskiarvot.

Taulukko 6. Tasokalibraattorien mitatut pitoisuudet laitekohtaisesti.

Taso 1	Laite 1	Laite 2	Laite 3	Laite 4
	3,8	4,1	4,1	3,9
	3,9	4,6	4,2	3,9
	3,9	3,7	4	3,7
	3,5	4,2	4,2	3,5
kes- kiarvo	3,8	4,2	4,1	3,8

Taso 4	Laite 1	Laite 2	Laite 3	Laite 4
	76,7	72,1	78	69,3
	74	80,6	74,8	72,7
	73	73,8	75,6	70,7
	79,6	73,5	75,2	70
kes- kiarvo	75,8	75	75,9	70,7

Taso 2	Laite 1	Laite 2	Laite 3	Laite 4
	8,9	10,1	9,7	10,1
	9	10	9,6	9,3
	9,7	9,4	9,7	9,6
	9,1	10,3	9,8	11
kes- kiarvo	9,2	10	9,7	10

Taso 5	Laite 1	Laite 2	Laite 3	Laite 4
	255	235	243	246
	228	229	258	244
	219	224	243	227
	234	236	237	218
kes- kiarvo	234	231	245,3	233,8

Taso 3	Laite 1	Laite 2	Laite 3	Laite 4
	22,5	24,9	23,5	22,7
	23,5	24,5	26,5	22,7
	24,1	26	25,7	24,8
	27,6	24,6	23,7	26,5
kes- kiarvo	24,4	25	24,9	24,2

Laitteelle 1 laskettiin lisäksi keskihajonnat sekä 95 %:n luottamusvälit tasokohtaisesti (Taulukko 7.).

Taulukko 7. Laitteelle 1 lasketut tunnusluvut ja 95 % luottamusväli tasokohtaisesti.

Laite 1	Taso 1	Taso 2	Taso 3	Taso 4	Taso 5
Keskihajonta	0,2	0,4	2,2	3,0	15,3
Luottamusväli 95 %	0,3	0,6	3,5	4,7	24,3

Taulukossa 8. on esitetty Laitteelle 1 laskettu luottamusväli ja Laitteille 2-4 lasketut keskiarvot (taulukosta 6.). Taulukosta 8. on nähtävissä, että suurin osa eri laitteiden tuloksista osuu 95 %:n luotettavuusvälille. Tason K2 keskiarvot laitteilla 2-4 poikkeavat laitteelle 1 määritetystä luottamusvälistä 0,2 yksikköä. Menetelmien välistä eroa ei tässä työssä käsitellä

Taulukko 8. Laitteiden väliset erot 95 % luottamusvälin perusteella.

Taso	Väli (Laite 1)	Laite 2	Laite 3	Laite 4
K1	3,5–4,1	4,2	4,1	3,8
K2	8,6–9,8	10,0	9,7	10,0
K3	20,9–27,9	25,0	24,9	24,2
K4	71,1–80,5	75,0	75,9	70,7
K5	209,7–258,3	231,0	245,3	233,8

Kaikki yllä esitetyt tulokset olivat hyväksyntärajoissa Combination Test -ohjelmiston perusteella. Yleisesti voidaan todeta, että havaitut poikkeamat olivat vähäisiä. DELFIA manuaaliajon tuloksia ei esitetä tässä opinnäytetyössä.

7 POHDINTA

Tämän opinnäytetyön ensimmäisenä tutkimusongelmana oli selvittää muuttuuko kittikalibraattorin taso uuden tasokalibraattorin käyttöönotossa vertailemalla tuloksia toisiinsa. Toinen tutkimusongelma oli selvittää poikkeako uuden tasokalibraattorin taso referenssikallibraattorista ja kolmantena tutkimusongelmana oli selvittää onko analysaattoreiden ja menetelmien välillä merkittävää tulotason vaihtelua. Kaikkiin muihin tutkimusongelmiin saatiin vastaukset, paitsi menetelmien välistä vertailua ei tehty, koska työ oli jo hyvin laaja eikä aika riittänyt tulosten käsittelyyn. Kaikki saadut tulokset ovat hyväksyttäviä Combination Test – ohjelmiston perusteella sekä kemistin hyväksymiä.

Tämän opinnäytetyön tulosten mukaan standardien pitoisuuksien prosentuaalinen erotus uuden tasokalibraattorin käyttöönotossa kittieräkohtaisesti verrattuna referenssikallibraattoriin ei ole merkittävä (vrt. Pearce 2016b). Verrattaessa tuloksia New Yorkin viitearvoihin prosentuaaliset erot standardien välillä ovat pienimmillään (2-3 %) ja (0-3 %) merkittävimpien viitearvojen rajoilla, jotka ovat standardi arvojen S4 ja S5 lähettyvillä (ks. Pearce 2016a). Havaitut erot eivät siis ole kliinisesti merkittäviä. Myöskään kittierien välillä ei havaittu merkittävää vaihtelua, joten kittieräkohtainen vaihtelu on uuden tasokalibraattorierän käyttöönotossa minimoitu.

Tasokalibraattoreiden välisiä eroja verrattaessa ongelmaksi muodostui trimmatun keskiarvon käyttö Combinatin Test -ohjelmistossa, koska keskihajonnat sekä luotettavuusväli laskettiin aritmeettisen keskiarvon avulla. Tulosten luotettavuus on tästä syystä tämän vertailun osalta osin epäselvä. Kuitenkin 95 % luotettavuustason perusteella trimmatut tasokalibraattoreiden keskiarvot olivat riittävän lähellä toisiaan. Koska luottamusväli ilmoittaa välin, jolla perusjoukon suure tietyllä todennäköisyydellä sijaitsee, eivät todetut poikkeamat ole merkittäviä. (ks. Heikkilä 2014.) Menetelmän kyky laskea tuloksia ei ole riippuvainen käytetystä laitteesta, koska menetelmässä on huomioitu laitteiden antama tulostasonvaihtelu siten, että jokaiseen määrittelyyn tehdään oma standardisuora, jota vasten tulokset luetaan (ks. PerkinElmer 2016e). Vaihtelulle on kuitenkin asetettu hyväksyntärajat, jotka olivat Combination Test – ohjelmiston perusteella hyväksyttäviä. 95 %:n luottamusvälin perusteella tulokset olivat riittävän lähellä toisiaan ja todetut poikkeamat eivät olleen merkittäviä (ks. Heikkilä 2014).

Tutkimuksesta voidaan todeta, että kehitetyt toimenpiteet ovat riittäviä uuden referenssimateriaali erän käyttöönotossa. Opinnäytetyön tulosten perusteella kehitettiin tulosten

käsittelyä ja analysointia, joka oli tämän opinnäytetyön tarkoitus. Kehitetyt toimet liittyivät Combination Test-ohjelmistoon ja ovat salassa pidettävää tietoa, joten niitä ei ole esitetty tässä työssä. Opinnäytetyön tulosten perusteella laadittiin luonnos menettelyohjeesta Wallac Oy:n käyttöön, jossa kuvattiin kehitetyt toimet. Lopullisen menettelyohjeen teko jäi Wallac Oy:n tehtäväksi ajan puutteen vuoksi.

Opinnäytetyön teossa on käsitelty laajasti työn taustalla olevaa teoriaa ja ajankohtaista tutkimustietoa. Lähteiden kerääminen aiheen ollessa niin spesifinen oli haastavaa ja aikaa vievää. Lähteiksi valittiin runsaasti yleisesti tunnettuja ja luotettavia lähteitä. Työ sisälsi vaikeita asiakokonaisuuksia, joiden ymmärtämiseen kului huomattavan paljon enemmän aikaa kuin aluksi oli ajateltu. Kuitenkin tutkimus on tehty huolellisesti ja hyviä tieteellisiä käytäntöjä noudattaen. Käytännön osuuden AutoDELFIA määritykset oli aikaisemman työharjoittelujaksolla opitun kertaamista, joka lisäsi tutkimuksen kokeellisen osuuden luotettavuutta. Myös tulokset on tarkastanut asiaan perehtynyt kemisti, joka lisää tulosten oikeellisuuden luotettavuutta. Tekijälle uuden menetelmän eli manuaalimäärityksen käytännön opettelu puolestaan lisäsi tekijän ammattitaitoa vaikka tuloksia ei työssä käsiteltykään. Tutkimuksen aineistona käytettiin kaupallisia valmisteita, joten niiden käsittelyyn ei liittynyt eettisiä kysymyksiä. Tutkimuksen kulku on pyritty kuvailemaan niin tarkasti kuin salassapitosopimuksen puitteissa on pystytty tekemään.

Työn olisi voinut toteuttaa osittain toiminnallisena opinnäytetyönä, jolloin pääpaino olisi siirtynyt menettelyohjeen tekoon. Jatkotutkimusaiheiksi ehdotetaan kehitettyjen toimenpiteiden toimivuuden testaamista, jonkin toisen referenssimateriaalin käyttöönotossa. Tällöin voisi varmistaa, että kehitetyt toimet soveltuvat myös muille referenssimateriaaleille ja laatia luonnoksesta menettelyohje sekä syventyä paremmin Combination Test -ohjelmistoon.

LÄHTEET

Anttila, P. 2005. Ilmaisuu, teos, tekeminen ja tutkiva toiminta. Hamina; Akatiimi.

Barra, C., Silva, I., Pezzuti, I. & Januario J. 2012. Triagem neonatal para hiperplasia adrenal congenita. Revista da Associacao Medica Brasileira. Vol. 58, No 4, 459-464.

Fingerhut, R. 2009. False positive rate in newborn screening for congenital adrenal hyperplasia (CAH)—ether extraction reveals two distinct reasons for elevated 17 α -hydroxyprogesterone (17-OHP) values. Steroids. Vol. 74, No. 8, 662-665. Viitattu 19.11.2016. Saatavilla myös sähköisesti: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.turkuamk.fi/science/article/pii/S0039128X09000567>.

Haapala, A. 2010. Allergian ja autoimmuunisairauksien laboratoriodiagnostiikka. Teoksessa O. Niemelä & K. Pulkki (toim.) Laboratoriolääketiede. Helsinki; Kandidaattikustannus Oy.

Halonen, T. 2004. Immunokemiallisten menetelmien periaatteet. Teoksessa I. Penttilä (toim.). Kliiniset laboratoriotutkimukset. Helsinki; WSOY.

Hirsjärvi, S., Remes, P. & Sajavaara, P. 2004. Tutki ja kirjoita, 10., osin uud. p. Helsinki; Tammi.

Heikkilä, T. 2014. Tilastollinen tutkimus, 9, uud. p. Helsinki; Edita.

Huber, P. 1981. Robust Statistics; John Wiley & Sons. (ks. Soukka 2011).

Jaarinen, S. & Niiranen, J. 2005. Laboratorion analyysitekniikka, 5. uud. p. Helsinki; Edita.

Lapatto, R. 2015. Vastasyntyneiden aineenvaihduntasairauksien seulonta. Moodi. Vol 39, No 2, 62-63.

Marumudi, E., Khadgawat, R., Surana, V., Shabir, I., Joseph, A. & Ammini, A.C. 2013. Diagnosis and management of classical congenital adrenal hyperplasia. Steroids. Vol. 78, No 8, 741-746. Viitattu 12.11.2016. Saatavilla myös sähköisesti: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.turkuamk.fi/science/article/pii/S0039128X13000895>.

MIKES. 2011. Laadukkaan mittaamisen perusteet. Teoksessa E. Hiltunen, L. Linko, S. Hemminki, M. Hägg, E. Järvenpää, P. Saarinen, S. Simonen, P. Kärhä. (toim.) Laadukkaan mittaamisen perusteet. Mittatekniikan keskus; Metrologian neuvottelukunta. Viitattu 23.2.2017. Saatavilla sähköisesti osoitteesta <http://www.vtt.fi/inf/pdf/MIKES/2011-J4.pdf>.

Myllynen, P. & Risteli, L. 2016. Vastasyntyneiden aineenvaihduntatautiin seulonta. Moodi. Vol 40, No 3-4, 106-108.

Pearce, M., Demartino, L., McMahon, R., Hamel, R., Maloney, B., Stansfield D., McGrath, E. C., Gearhart A. & Caggana M. 2016a Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in New York State. Molecular Genetics and Metabolism Reports. Vol. 7, 1-7.

Pearce, M., Dauerer E., DiRienzo A., Caggana M. & Tavakol N. 2016b. The influence of seasonality and manufacturer kit lot changes on 17 α -hydroxyprogesterone measurements and referral rates of congenital adrenal hyperplasia in newborns. European Journal of Pediatrics. Vol. 1, No 176, 121-129.

Peda 2017. Erilaisia kemiallisia reaktioita. Viitattu 15.3.2017. https://peda.net/jao/schildtin_lu_kio/kurssit/kemia/krje/kl2p2/orbitaali3/orbitaali3-1301152/kr/ekr2.

PerkinElmer. 2015a. DELFIA Immunoassays. Viitattu 15.3.2017. <http://www.perkinelmer.com/fi/lab-products-and-services/application-support-knowledgebase/delfia/delfia-immunoassays.html>.

PerkinElmer. 2015b. DELFIA Time-resolved fluorescence assay. Viitattu 15.3.2017. <http://www.perkinelmer.com/fi/lab-products-and-services/application-support-knowledge-base/delfia/delfia-trf-assays.html>.

PerkinElmer. 2015c. Wallac. Viitattu 5.4.2017. <http://www.perkinelmerfinland.fi/diagnostiikka/wallac>.

PerkinElmer. 2016a. AutoDELFIA Neonatal 17 α -OHP kit. Viitattu 22.2.2017. https://newbornscreening.perkinelmer.com/products/auto_delfia_instrument/autodelfia_neonatal_17_ohp_kit >AutoDELFIA Instrument brochure.

PerkinElmer. 2016b. Congenital Adrenal Hyperplasia. Viitattu 9.11.2016. Saatavilla sähköisesti osoitteessa: http://newbornscreening.perkinelmer.com/disorders/primary_newborn_screening_disorders/congenital_adrenal_hyperplasia.

PerkinElmer. 2016c. DELFIA Neonatal 17 α -OH-progesterone kit. Viitattu 12.3.2017. https://newbornscreening.perkinelmer.com/products/victor_2d_instrument/delfia_neonatal_17_oh-progesterone_kit.

PerkinElmer. 2016d GSP 17A-OH-Progesterone kit. Viitattu 9.11.2016. Saatavilla sähköisesti osoitteessa: http://newbornscreening.perkinelmer.com/products/gsp_instrument/gsp_neonatal_17_oh-progesterone_kit.

PerkinElmer. 2016e. Tasokalibraattori. Perehdytysmateriaali. Viitattu 14.11.2016.

Pezzutti I., Barra C., Mantovani R., Jose J. & Ivani I. 2014. A three-year follow-up of congenital adrenal hyperplasia newborn screening. *Jornal de pediatria*. Viitattu 19.11.2016. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021755714000242>.

SASKE 2016a. Lisämunuaiskuoren liikakasvu eli hyperplasia. Viitattu 15.11.2016. [vsshp.fi](http://www.vsshp.fi) > Saske > Seulottavat sairaudet > Tarkempaa tietoa sairauksista > Lisämunuaiskuoren liikakasvu eli hyperplasia (CAH, congenital adrenal hyperplasia). <http://www.vsshp.fi/fi/saske/esitteet/Documents/Suomi%20VasSeu1%20esite.pdf>.

SASKE 2016b. Vastasyntyneiden aineenvaihduntasairauksien seulonta. Viitattu 9.11.2016. [vsshp.fi](http://www.vsshp.fi) > Saske > Esitteet > Vastasyntyneiden aineenvaihduntasairauksien seulonta. <http://www.vsshp.fi/fi/saske/esitteet/Documents/Suomi%20VasSeu1%20esite.pdf>.

Savolainen, K. & Parviainen, M. 2010. Immunkemialliset menetelmät. Teoksessa O. Niemelä & K. Pulkki (toim.) *Laboratoriolääketiede*. Helsinki; Kandidaattikustannus Oy.

Stevens B., Al-Nuaimb A. R., Abdullahc M. A., Zain M. & Melhac A. A. 1995. Pattern of blood 17-hydroxyprogesterone concentration and distribution among neonates in Saudi Arabia. *Screening*. Viitattu 19.11.2016. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092561649500112Y>.

Sosiaali- ja Terveysministeriö (STM). 2014. STM suosittelee synnynnäisten aineenvaihduntasairauksien seulonnan laajentamista. Viitattu 18.2.2017 http://stm.fi/artikkeli/-/asset_publisher/stm-suosittelee-synnynnaisten-aineenvaihduntasairauksien-seulonnan-laajentamista.

Soukka, K. 2011. Havaintoaineiston trimmauksen vaikutus otoskeskiarvoihin. Teknillinen korkeakoulu. Viitattu 15.4.2017. Saatavilla sähköisesti http://salserver.org.aalto.fi/vanhat_sivut/Opinnot/Mat-2.4108/pdf-files/esou01a.pdf.

Suominen, I.; Pärssinen, R.; Haajanen, K. & Pelkonen, J. 2010. *Geenitekniikka*. Turun ammatti-korkeakoulu.

TAK 2014. Suomalaisten alkoholiostot virossa. Viitattu 16.4.2017. http://www.panimo-liitto.fi/app/uploads/2015/02/TAK_Suomalaisten-alkoholiostokset-Virosta_2014.pdf.

TENK 2012. Tutkimuseettinen neuvottelukunta. Hyvä tieteellinen käytäntö. Viitattu 2.5.2017. <http://www.tenk.fi/> > hyvä tieteellinen käytäntö.

Terveysportti. 2015. Synnynnäinen lisämunuaishyperplasia (Orphanet). Viitattu 9.11.2016. http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=orp01491&p_teos=orp&p_osio=100&p_selaus=.

Tieteen termipankki. 2017. Fluoresenssi. Viitattu 18.3.2017. <http://tieteentermipankki.fi/wiki/Biologia:fluoresenssi>.

Tieteen termipankki. 2014. Vasta-aine. Viitattu 18.3.2017. <http://tieteentermipankki.fi/wiki/Nimitys:vasta-aine>.

Tilastokeskus. 2017. Luottamusväli. Viitattu 30.3.2017. <http://www.stat.fi/meta/kas/luottamusvali.html>.

Van Emon, J.M. 2007. Immunoassay and other bioanalytical techniques. DELFIA-CDI. Boca Raton ;CRC Press.

Vilka, H. 2007. Tutki ja mittaa : määrällisen tutkimuksen perusteet. Helsinki; Tammi.

VITA. 2014. Hydroksiprogesteroni (-17). Laboratoriokäsikirja.Viitattu 20.11.2016.

Votava, F., Novotna, D., Kracmar, P., Vinohradská, H., Stahlova-Hrabincova, E., Vrzalova Z., Neumann, D., Malikova, J., Lebl, J., Matern D. & 10 others . 2012. Lessons learned from 5 years of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in the Czech Republic: 17-hydroxyprogesterone, genotypes, and screening performance. European journal of pediatrics. Vol. 171, No 6, 935-940.

VSSHP. 2017. Näytteenotto-ohjeet. Viitattu 12.3.2017. <http://www.vsshp.fi/fi/saske/ammattilaisille/nayteenottajille/Sivut/default.aspx>.

Whicher, J. 1998 Secondary reference materials. Clinical biochemistry. Vol. 31, No 6, 441-446.

Åkerman, K. 2010. Immunokemialliset analysointimet. Teoksessa O. Niemelä & K. Pulkki (toim.) Laboratoriolääketiede. Helsinki; Kandidaattikustannus Oy.

Åkerman, K. & Jokela, H. 2010. Fotometria. Teoksessa O. Niemelä & K. Pulkki (toim.) Laboratoriolääketiede. Helsinki; Kandidaattikustannus Oy.